

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 : 微量乙醇對脂雙層與脂質單分子層物化性質影響之研 *
* 名 稱 : 究 *
* ***** *

執行計畫學生： 黃雅涵
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-041-005-E
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 周宗翰

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

中華民國 99年04月28日

(一)、摘要

微脂粒是一種可包覆藥物的脂質微粒，其具有許多適合人體的理想特性，因此常被當作藥物遞送載體來使用。本專題嘗試添加微量酒精以低溫的方式製備微脂粒。在不同製備溫度下，製備不同比例混合 Egg yolk phosphosphatidylcholine(EPC) 與 Cholesterol(CHOL) 的微脂粒，並觀察其粒徑大小分佈與界面電位等性質在室溫下隨時間的變化，以了解微量酒精及膽固醇的存在對 EPC 微脂粒物理化學性質的影響。除此之外，為了解脂質層內分子間的作用力，本專題擬藉由 Langmuir 單分子層的表面壓-分子佔據面積等溫線的量測的實驗，探討不同溫度下，不同比例混合 EPC/CHOL 單分子層在空氣/水與在空氣/乙醇水溶液不同界面上之行為。

關鍵詞：微脂粒、EPC、Cholesterol、單分子層

(二)、研究動機與研究問題

微脂粒自 1960 年代由 Bangham 發現以來，即成為生物膜與藥物輸送系統的重要研究領域。由於微脂粒特殊的中空球體構造[1]，吸引許多科學家利用微脂粒作為藥物載體可行性之研究，科學家們認為，在微脂粒脂雙層中空球體的結構可包覆疏水性藥物，在內部水相區中則可包覆水溶性藥物。此外，微脂粒為天然物質所組成，與人體細胞間具有良好的生物相容性(compatible) 及生物可分解性(biodegradable)[2]，所以顯示出微脂粒在藥物輸送方面具有很大之應用潛能。值得關注的是微脂粒在到達藥物釋放控制的目的地之前要能保持穩定，但微脂粒很容易因為物理、化學及生物穩定性產生外觀上的改變[3]，因此微脂粒的穩定性，一直備受重視。而單分子層的研究是一種提供分子間作用力訊息的基本方法，所以針對微脂粒的組成成分進行混合單分子層的研究[4-6]，將有助於探討微脂粒的穩定性。

一般製備微脂粒的方法，習慣以高溫約 60°C (大於磷脂質相轉移溫度)進行超音波震盪，本專題主要期盼發展低溫製備微脂粒的方式，以包覆不能承受高溫的活性原料，例如酵素等活性成分。並透過微脂粒與單分子層實驗結果做比較，以了解兩者之間的關聯性及混合組成分子間的交互作用。加上國內外文獻及書刊尚未提出低溫製備微脂粒及添加微量酒精的做法，所以學生認為仍有相當大的空間值得深索，期望能提昇微脂粒在應用上的潛力與發展。

(三)、文獻回顧與探討

微脂粒是將脂質或磷脂質分散在液相中所形成的小球，為一層或多層被水相隔開的脂質雙層所形成的同心球體結構。形成微脂粒的磷脂質分子為兩性物質(amphiphile)，它是由磷酸根基團組成的親水(hydrophilic) 極性頭基，以及兩條疏水(hydrophobic) 的脂肪酸鏈所構成。當磷脂質分子分散於水中時，會因為兩端親、疏水性作用的不同，造成親水性頭基指向水相，而疏水性的脂肪酸鏈會傾向

彼此排列緊密，而自我聚集(self-assembly) 成一封閉的中空球體，此即為微脂粒[7]。由於這種特殊的中空球體結構，使得微脂粒可同時作為親水性或疏水性藥物的載體；其中親水性藥物可被包覆於中心水相，而疏水性藥物則可被包覆在脂雙層的夾層中[8]。而且具有生物可分解性及最低的毒性，在過去二十年已有許多研究的重點集中在建立微脂粒為藥物輸送的載體[8,9]。此外，為了能使藥物到達特定的細胞，主動標定的微脂粒藥物輸送系統也已經廣泛被研究[10]。

早期製備微脂粒的方式，大部分是以薄膜形成、高溫水合再以高溫超音波震盪或是高溫擠壓成型的方式方可製備成粒徑小、單層的微脂粒。此類高溫製程對於包覆熱敏感物質例如蛋白質、酵素等勢必產生限制。因此開發一低溫製備微脂粒的方式是極為需要的。人工膠體界面系統尤其是關於磷脂質(phospholipid) 和其他兩性(amphipathic) 材料的熱力學特徵之研究，對於微脂粒混合系統的特徵及每個組成對系統穩定性影響的基本瞭解是非常有用的。這些微脂粒物化性質的資訊在微脂粒藥物傳輸系統的適當材料選擇上，一直是必要的，並且可以有效減少製備過程中所需的試誤步驟。因此，此專題計畫將透過有系統的實驗設計，探討超音波震盪溫度對不同比例混合 EPC/CHOL 微脂體的各項物理特徵的影響。

除此之外，Langmuir 單分子層的技术常被使用來探討氣/液界面上分子間的交互作用。它是由疏水性物質如Teflon 所作成的方形槽子，內部可裝水溶液。上方有一個可移動阻隔棒(moveable barrier) 可控制界面面積的大小。將材料溶於有機溶劑中，再散佈於水面上可形成單分子層。在氣/液界面上不溶性單分子層的行為，可藉由表面壓-每分子佔據面積等溫線(surface pressure-area per molecule isotherm) 的量測進行研究，單分子層的表面壓會隨分子佔據面積的壓縮而改變，從圖3-3可發現在整個壓縮過程中，在 π -A等溫線可能會出現幾個狀態，即氣相(gas phase)、液態伸展相(liquid-expanded phase)、液態凝縮相(liquid-condensed phase)、固態相(solid phase)、崩潰相(collapse phase)，如圖3-1所示[11,12]。氣態相是指分

子間的距離很遠，界面上兩性分子處於平躺的狀態，分子間的作用力較小。隨著阻隔棒壓縮，分子間的距離變小，分子間的作用力變大，原本躺平的分子可能會慢慢先傾斜而直立，等溫線上則可能依序出現液態伸展相、相過渡區、液態凝縮相、固態相。最後當單分子層被壓縮至一分子排列最緊的極限狀態，若再施力壓縮將導致單分子層崩潰(collapse)，此點稱為崩潰點。

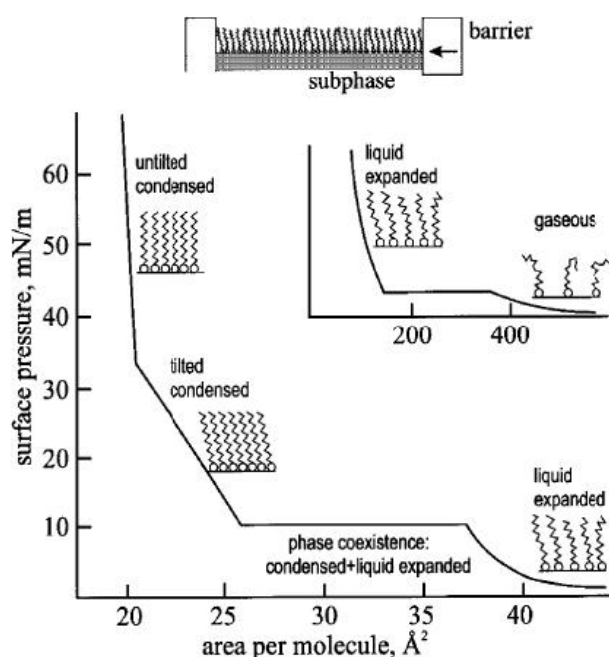


圖3.1 表面壓-每分子佔據面積(π -A)等溫線圖[12]。

由於磷脂質為細胞膜中的主要成分，科學家們對於磷脂質的生物物理行為相當感興趣，因此有許多科學家致力於研究單分子層與脂雙層之間的關係[5,10]。在單分子層的實驗中，如果有兩種界面活性物質分布於氣/液界面，則可形成所謂的雙成分混合單分子層，由於分子間作用力的不同，會影響單分子層的混合情形。

由於Egg yolk phosphosphatidylcholine(EPC) 第二條碳鏈上含大量的不飽和鍵，其相轉移溫度相較於HSPC 的 52°C [13]低很多，約為 -5°C [14]左右，且分子佔據空間也會較大。但在合成微脂粒時，通常還會加入其他的成分，如膽固醇。

因為膽固醇可增加膜內的穩定性及降低膜的通透性，以有利於微脂粒做藥物載體時，降低藥物外漏情形[15-18]，除此之外，膽固醇的添加也可增加EPC 的膜堆積密度。本專題嘗試使用低溫的方式製備微脂粒，但微脂粒未到達相轉移溫度導致的不穩定性卻是一大問題[19]。有文獻指出，添加酒精可降低微脂粒的相轉移溫度[20]，但礙於實驗成功後要進一步包覆活性成分於化妝品中，故只添加微量酒精看其穩定性及其影響。

因此，本專題在製備微脂粒時，在不同溫度下分別添加純水、5%、10%、20%的酒精水溶液，以了解組成對微脂粒安定性的影響。另外將藉由混合單分子層界面行為的研究，探討EPC/CHOL 在氣/液界面的行為，且次相(subphase)分別以純水、5%、10%、20%酒精水溶液做進一步的研究，並討論混合成分及微量酒精在單分子層的行為與微脂粒系統的關聯性。

(四)、研究方法及步驟

4.1 製備微脂粒

事先以氯仿：甲醇 1：1(v/v) 為溶劑配置脂質及膽固醇母液。分別取所需之體積於 25ml 圓底瓶中，利用旋轉濃縮儀將圓底瓶內的有機溶劑抽乾之後，即可在瓶壁上形成均勻的脂質膜，再加入 4ml 去離子水(或 5%、10%、20%酒精水溶液)於適當水浴溫度下進行水合。水合後取出，置入超音波振盪儀震盪 40 分鐘，溫度以 10°C 製備。最後，收集濾液裝入透明樣品槽中，以雷射粒徑分析儀進行粒徑分佈與界面電位的量測。並將樣品置於室溫下，定期觀察微脂粒分散液粒徑分佈與界面電位隨時間變化的情形，作為判斷不同組成對 EPC/CHOL 微脂粒物理穩定性的影響。

4.2 表面壓-每分子佔據面積等溫線的量測

本專題採用 Nima 601A 槽子(Nima technology, UK.)，主要是由面積 600 cm² 的

Teflon 所構成的方形槽子，內部可裝水溶液。上方有可移動式阻隔棒(moveable barrier)可控制界面面積的大小。將 Langmuir 沉積系統的鐵氟隆槽，以純水清洗，然後於槽中加滿純水(或 5%、10%、20% 酒精水溶液)。以濾紙做為測量表面壓所需的威氏平板。透過循環水槽的控制，使鐵氟隆槽內的溶液溫度為 24°C，等待約 30 分鐘以確保水溫達恆定值，以及讓水溶液中的雜質吸附氣/液界面上，以便進行氣/液界面的清潔程序。若表面壓值變化大於 $\pm 0.2 \text{ mN/m}$ ，則以連接抽氣幫浦的吸管吸取界面液層，直到表面壓值的變動小於 0.2 mN/m 為止，並將表面壓歸零。微量注射器先用洗劑(氯仿：甲醇= 1：1)清洗數次，再吸取待測溶液，平均散佈在鐵氟隆槽液面上不同位置處，靜置約 10 分鐘，使溶劑完全揮發。最後藉由電腦控制阻隔棒移動速率進行單分子層的壓縮，即可得到不同分子佔據面積下各單分子層的表面壓。

(五)、結果與討論

微脂粒的物理穩定度的檢測，我們是利用微脂粒粒徑的變化量做物理穩定度的指標值[2]，當粒徑大小分佈為 1000 nm 即判定為不穩定。每次量測微脂粒粒徑前，我們將會對待測物做搖晃，以期許量測到微脂粒粒徑變化是融合後的現象。

EPC 第二條碳鏈上含大量的不飽和鍵，其相轉移溫度為 -5°C [14]左右，且分子佔據空間也較大，但若不含 CHOL 其在微脂粒表面會有相分離或無秩序的物理性質。因此在專題計畫嘗試混合 EPC/CHOL 微脂粒，並添加微量酒精降低微脂粒的相轉移溫度。在 10°C 下製備不同比例混合 EPC/CHOL 微脂粒之初始平均粒徑、粒徑分佈係數和平均界面電位及微脂粒穩定天數，如為表 5-1 所示。混合 EPC/CHOL (10/0~5/5)微脂粒穩定度差，可能是因為初始粒徑分佈較廣，且微脂粒呈電中性，因此容易產生微脂粒融合現象。脂雙層中添加膽固醇之微脂粒，隨著增加膽固醇的添加量，外觀會漸成混濁狀，且隨時間久遠而粒徑變大的趨勢則越來越明顯。但只添加 10%、20% 的膽固醇，有助於提升微脂粒的物理穩定度。

由於膽固醇的嵌入，脂雙層影響微脂粒脂雙層表面物性之安定度，有助於降低膜的流動性，故可提高其穩定性。但添加膽固醇增加脂雙層膜的硬度，對於低溫製備微脂粒的系統，卻有無法將粒徑打小的影響。

在 10°C 下添加 5% 酒精製備不同比例混合 EPC/CHOL 微脂粒之初始平均粒徑、粒徑分佈係數和平均界面電位及微脂粒穩定天數，如表 5-2 所示。表中顯示添加 5% 酒精可明顯使混合 EPC/CHOL(10/0~9/1)微脂粒初始粒徑變小，但添加超過 20mol% CHOL 對初始粒徑及穩定性沒有太大的效果，可能是因為 CHOL 添加量增加，影響微脂粒之流動性，導致 5% 酒精無法有效的提高其穩定性。雖添加 5% 酒精，可明顯降低微脂粒之初始粒徑，但對微脂粒的穩定性，並無太大的效果。

表 5-3 為在 10°C 下添加 10% 酒精製備不同比例混合 EPC/CHOL 微脂粒初始平均粒徑、粒徑分佈係數和平均界面電位及微脂粒穩定天數。添加 10% 酒精可明顯使 EPC/CHOL(10/0~7/3)微脂粒初始粒徑變小，但 EPC/CHOL(6/4~5/5)微脂粒之初始粒徑卻沒有太大的影響，可能因為添加超過 40mol% 膽固醇，微脂粒脂雙層膜的堅硬度增加，在低溫製備及添加微量酒精無法讓 EPC/CHOL 微脂粒穩定很長一段時間。

圖 5-1 中為 24°C 下，空氣/水界面上不同混合比例之 EPC/CHOL 混合單分子層的表面壓-每分子佔據面積(π -A)等溫線。不同比例混合單分子層的總分子數皆保持固定，而混合單分子層的性质是以不同比例的 CHOL 進行探討。圖 5-1 中的曲線 1 和曲線 7 分別代表純 EPC 和純 CHOL 單分子層的等溫線，由等溫線得知，在壓縮過程中純 EPC 和純 CHOL 單分子層沒有相轉移區的出現，且 EPC 單分子層的等溫線形狀，可觀察到分子較為擴張(expanded)的單分子行為，可能和 EPC 分子為不飽和磷脂質，碳鏈分子間的作用力大有關；CHOL 單分子層較為凝縮(condensed)，與 CHOL 會提高脂雙層膜之硬度有關。圖 5-1 得知 $X_{\text{CHOL}}=10-50$ mol%，等溫線比純 EPC 等溫線向左偏移，往較小的分子佔據面積移動，推測可

能添加 CHOL 使混合 EPC/CHOL(9/1~5/5)單分子層不易被壓縮。

此外，根據相律，當兩種成分的分子是相互混合的方式存在於氣/液界面上時，其崩潰壓與組成有關，當兩個互相混合的成分，其混合單分子層的等溫線則不會出現兩個純成分個別的崩潰壓，反之，若兩個成分不互相混合，其混合單分子層的等溫線會表現出兩個純成分個別的崩潰壓。由圖 5-1 可看出混合 EPC/CHOL 單分子層不同混合比例皆只出現單一的崩潰壓，並沒有兩種純成分個別的崩潰壓，因此可判斷在專題中所採用的混合比例 EPC 與 CHOL 兩種分子在氣/液界面上是能互相混合的。

圖 5-2 中為 24°C 下，空氣/5%酒精界面上不同混合比例之 EPC/CHOL 混合單分子層的表面壓-每分子佔據面積(π -A)等溫線。圖中曲線 1 和曲線 7 分別代表 EPC 和 CHOL 單一成分單分子層的等溫線。由圖 5-2 的結果可發現 EPC/CHOL 混合單分子層-每分子佔據面積等溫線的形狀與次相有關，當次相為 5%酒精時，單分子層等溫線有相變區的出現，且崩潰壓在 30~40mN/m 左右，比空氣/水界面的結果約低 10mN/m 左右。此外，圖 5-2 中可觀察到混合單分子層的崩潰壓隨組成而變，由此可知 EPC 和 CHOL 在空氣/5%酒精界面是可互相混合的。

圖 5-3 中為 24°C 下，空氣/10%酒精界面上不同混合比例之 EPC/CHOL 混合單分子層的表面壓-每分子佔據面積(π -A)等溫線。圖中曲線 1 和曲線 7 分別代表 EPC 和 CHOL 單一成分單分子層的等溫線。次相為 10%酒精時，單分子層等溫線的相變區變得較不明顯，崩潰壓約為 20~30mN/m 比氣/5%酒精單分子層約低 10mN/m。為證實 EPC/CHOL 單分子層崩潰壓是否會因為增加酒精濃度而減少，圖 5-4 次相為 20%酒精。次相為純水時，崩潰壓約為 40~50mN/m 左右；次相為 5%酒精時，崩潰壓約為 30~40mN/m 左右；次相為 10%酒精時，崩潰壓 mN/m 左右；次相為 20%酒精時，崩潰壓約為 20mN/m 左右。顯示當次相提高酒精濃度時，其表面壓會依續降低，推測表面壓的變化與單位面積中混合單分子膜的密度有關，因此推測次相為酒精時，會降低膜的密度。

表 5-1 在 10°C 製備不同比例混合 EPC/CHOL 微脂粒初始粒徑、P.dI.、界面電位與穩定天數

Compositions Molar ratio	A.P.S (nm) initial	P.dI. initial	Z.P. initial	Stable days
EPC/CHOL				
10/0	257.2±9.20	0.292±0.024	4.54±9.39	<1
9/1	255.3±7.05	0.325±0.038	5.92±3.12	<7
8/2	242.2±5.12	0.310±0.014	-5.8±7.50	<3
7/3	283.2±9.95	0.368±0.019	-2.56±8.48	<2
6/4	329.9±6.29	0.322±0.030	15.39±8.43	<1
5/5	372.9±7.65	0.350±0.002	-13.36±9.97	<1

Each value is shown as mean ±S.D., n =3

A.P.S.: Average particle size

P.dI.: Polydispersity index

Z.P.: Zeta potential

表 5-2 在 10°C 添加 5% 酒精製備不同比例混合 EPC/CHOL 微脂粒初始粒徑、P.d.I.、界面電位與穩定天數

Compositions Molar ratio	A.P.S (nm) initial	P.d.I. initial	Z.P. initial	Stable days
EPC/CHOL				
10/0	158.3±3.75	0.274±0.004	-2.83±9.87	<28
9/1	176.0±9.04	0.284±0.033	-2.63±8.56	<28
8/2	241.7±9.05	0.316±0.010	-6.78±4.95	<21
7/3	245.3±9.37	0.317±0.005	5.88±4.49	<17
6/4	419.7±9.13	0.337±0.014	6.82±8.52	<3
5/5	346.6±9.66	0.368±0.010	-7.12±9.02	<3

Each value is shown as mean ±S.D., n =3

A.P.S.: Average particle size

P.d.I.: Polydispersity index

Z.P.: Zeta potential

表 5-3 在 10°C 添加 10% 酒精製備不同比例混合 EPC/CHOL 微脂粒初始粒徑、P.d.I.、界面電位與穩定天數

Compositions Molar ratio	A.P.S (nm) initial	P.d.I. initial	Z.P. initial	Stable days
EPC/CHOL				
10/0	171.5±3.75	0.285±0.004	-3.61±4.87	<28
9/1	203.8±9.04	0.307±0.033	-5.57±3.17	<21
8/2	209.6±8.62	0.266±0.005	-9.79±6.02	<21
7/3	302.5±9.98	0.311±0.008	-7.07±6.04	<14
6/4	360.2±5.77	0.310±0.018	-16.39±3.36	<7
5/5	574.9±4.65	0.353±0.029	-15.36±9.71	<7

Each value is shown as mean ±S.D., n =3

A.P.S.: Average particle size

P.d.I.: Polydispersity index

Z.P.: Zeta potential

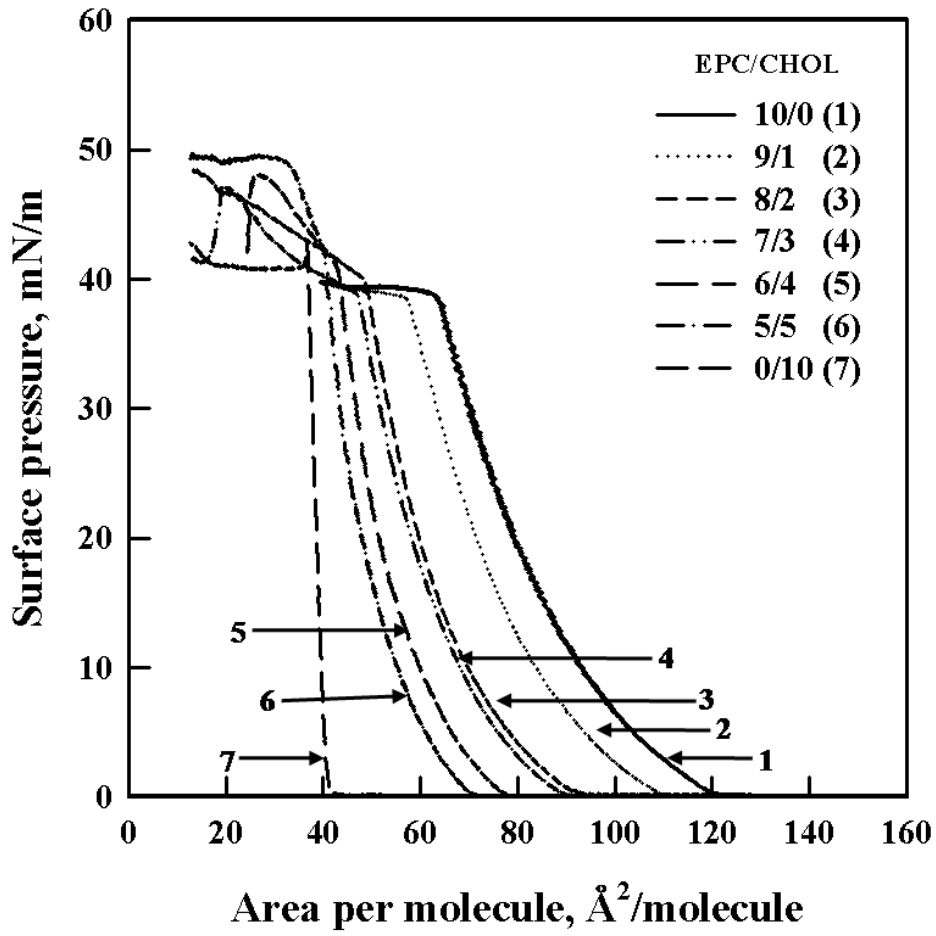


圖 5-1 在 24°C 下，在氣/液界面不同比例混合 EPC/CHOL 單分子層的表面壓-每分子佔據面積 (surface pressure-area per molecule, π -A) 等溫線

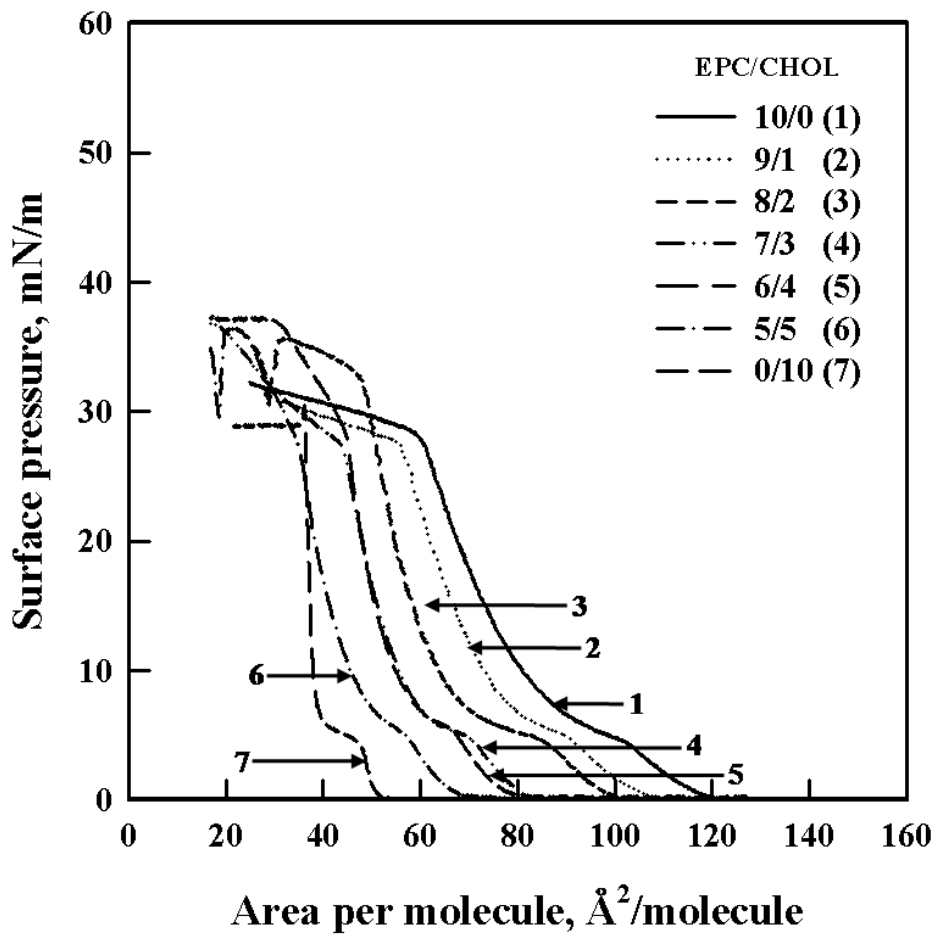


圖 5-2 在 24°C 下，在氣/5%EtOH 界面不同比例混合 EPC/CHOL 單分子層的表
面壓-每分子佔據面積 (surface pressure-area per molecule, π -A) 等溫線

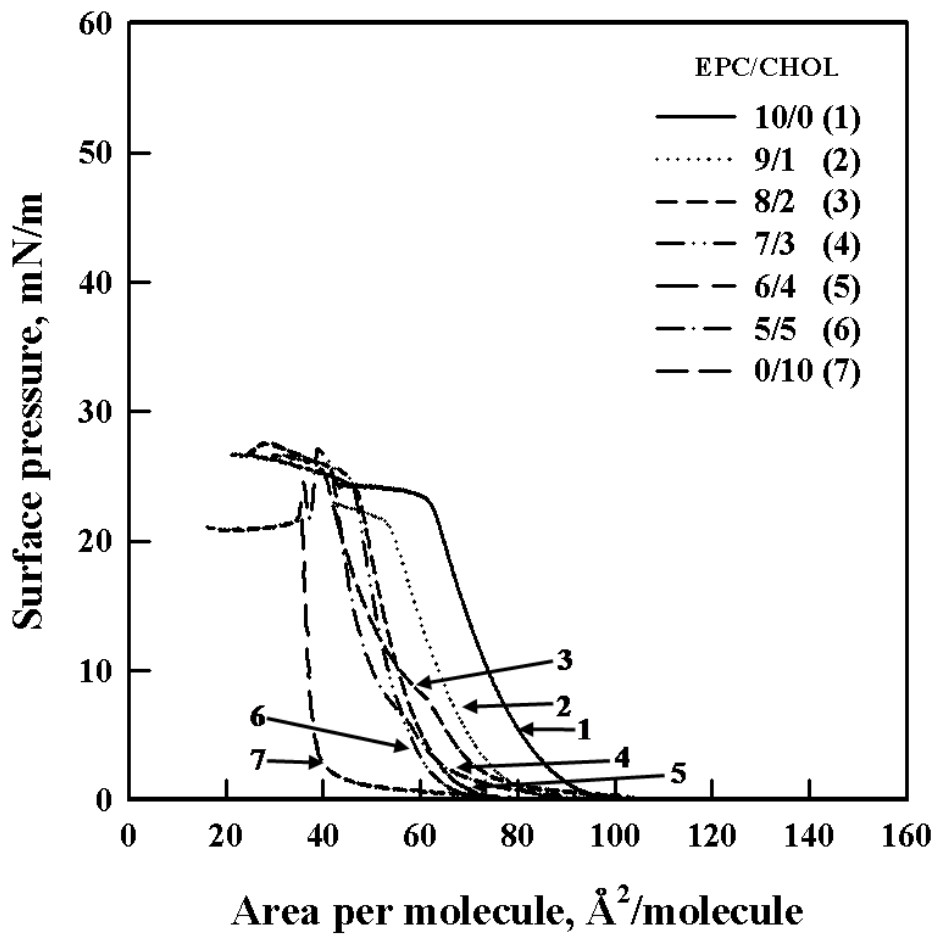


圖 5-3 在 24°C 下，在氣/10%EtOH 界面不同比例混合 EPC/CHOL 單分子層的表面壓-每分子佔據面積 (surface pressure-area per molecule, π -A) 等溫線

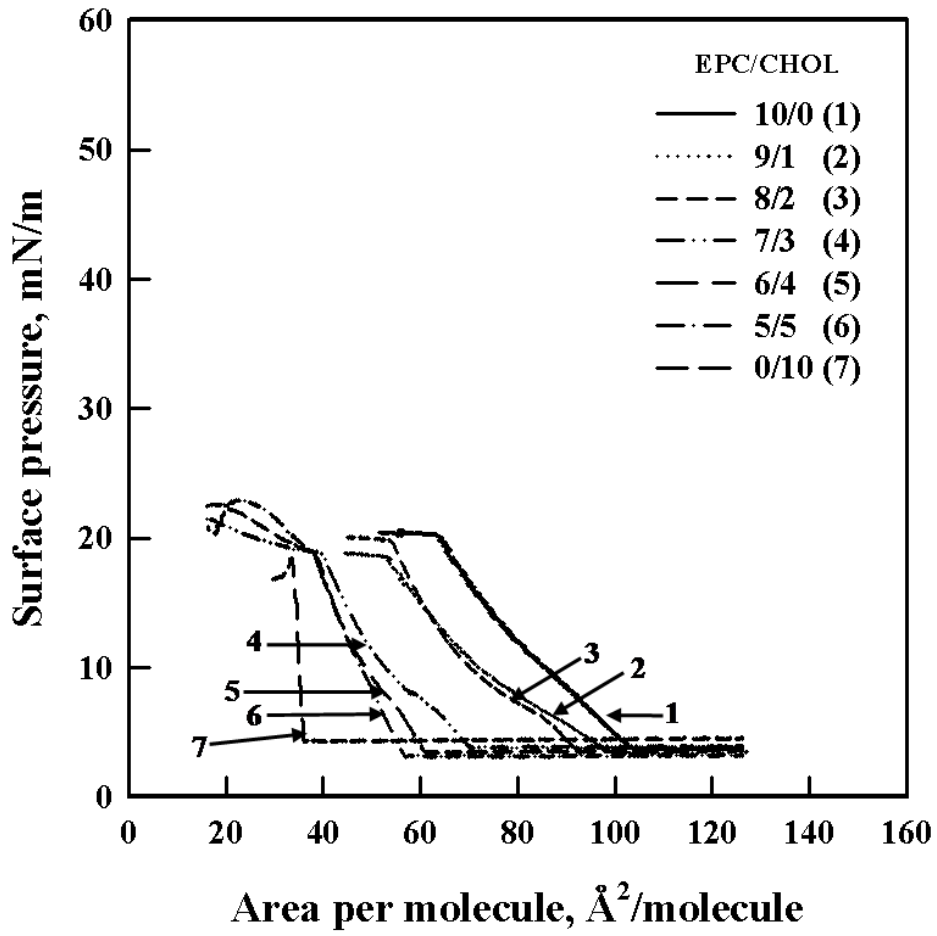


圖 5-4 在 24°C 下，在氣/20%EtOH 界面不同比例混合 EPC/CHOL 單分子層的表面壓-每分子佔據面積 (surface pressure-area per molecule, π -A) 等溫線

(六)、参考文献

1. A. D. Bangham, M. M. Standish, and J. C. Watkins, "Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids", *J. Mol. Biol.*, 13, 238-252(1965)
2. F. Frezard and A. Garniersuillerot, "Permeability of Lipid Bilayer to Anthracycline Derivatives – Role of the Bilayer Composition and of the Temperature." *Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism*, 1389:13-22(1998)
3. G. V. Betageri, S. A. Jenkins and D. L. Parson, "Pharmaceutical Applications of Liposomes in : Liposome Drug Delivery Systems." *Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster. Basel*(1993)
4. Chou, T.-H. and Chang, C.-H. *Colloids and Surf. B.* 17, 71. (2000b)
5. MacDonald, R.C. Rosoff, M. (Ed.), *Vesicles* (ch. 1), Marcel Dekker, Inc., New York. (1996)
6. Wójtowicz, K., Gruszecki, W.I., Walicka, M., and Barwicz, J. *Biochim. Biophys. Acta* 1373, 220. (1998)
7. D. L. Dan, "Novel applications of liposome", *TIBTECH*, 16, 307(1998).
8. Gregoriadis G., Leathwood P. D., Ryman B. E., "Liposome preparation and relation", *FEBS Lett.*, 14,95 (1970)
9. R.R.C. New, " liposome : a practical approach", Oxford University press, New York, (1990)
10. Jones, M.N., and D. Chapman., *Micells, Bilayers, and Biomembranes*,"Wiley-Liss, Inc.: New York, Chapter 4 (1995)
11. Birdi, K. S., "Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces", New York,(1989)

12. Kaganer V. M., Möhwald H., Dutta P., "Structure and phase transitions in Langmuir monolayers." *Rev. Mod. Phys.*, 71, 779-819 (1999)
13. Grit M., Underberg W. J. M., Crommelin D. J. A., "Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions." *J. Pharma. Sci.*, 82 (4), 362-366 (1993)
14. New R. R. C., "Liposomes: a practical approach." *Oxford University Press* (1990)
15. J. J. Collins and M. C. Phillips, "The Stability and Structure of Cholesterol-rich Codispersions of Cholesterol and Phosphatidylcholine", *J. Lipid Res.*, 23, 291-298 (1982)
16. R. P. Rand, V. A. Parsegian and J. A. C. Henry, "The Effect of Cholesterol on Measured Interaction and Compressibility of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers", *CAN. J. BIOCHEM.*, 58, 959-968, (1980)
17. E. F. Labelle and E. Racker, "Cholesterol Stimulation of Penetration of Unilamellar Liposomes by Hydrophobic Compounds", *J. Membrane Biol.*, 31, 301-315 (1977)
18. E. F. Labelle and E. Racker, "Cholesterol Stimulation of Penetration of Unilamellar Liposomes by Hydrophobic Compounds", *J. Membrane Biol.*, 31, 301-315 (1977)
19. H. Minami, T. Inoue, and R. Simozawa, "Beryllium Ion Can Induced the Aggregation of Phosphatidylcholine Vesicles", *Langmuir*, 12, 3574-3579 (1996)
20. Rowe, E. S. "Thermodynamic reversibility of phase-transitions specific effects of alcohols on phosphatidylcholines." *Biochim. Biophys. Acta* 813, 321-330 (1985).
21. Armengol, X., Estelrich, J., "Physical stability of different liposome compositions obtained by extrusion method" *J. Microencapsul.* 12, 525-535 (1995).